

Aus der Inneren Abteilung des Martin Luther-Krankenhauses,
Berlin-Grünwald.

Chefarzt: Professor Dr.med. Hans W i t z g a l l

Untersuchungen
über die Sulfonamid-Bindung
an isolierte Leberzellen der Ratte.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1964

vorgelegt von
Gottfried Tr ä n k m a n n
aus Chemnitz



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Inneren Abteilung des Martin Luther-Krankenhauses,
Berlin-Grünnewald.

Chefarzt: Professor Dr.med. Hans W i t z g a l l

Untersuchungen
über die Sulfonamid-Bindung
an isolierte Leberzellen der Ratte.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gottfried T r ä n k m a n n
aus Chemnitz

Dekan: Professor Dr. med. Hugo G a s t e i g e r

Referent: Professor Dr.med. Hans W i t z g a l l

Korreferent: Professor Dr.med., Dr.sc.h.c., Dr.med.vet.h.c.,
Dr.med.h.c. Hans Freiherr v. K r e ß



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 20. 7. 1964

Einleitung.

Die Sulfonamide sind das am häufigsten benutzte Modell für das Studium von Verteilungsvorgängen körperfremder Stoffe im Organismus. Einerseits waren dafür praktische Gesichtspunkte maßgeblich, wie der Wunsch, ihre klinische Wirkung zu verbessern oder zu spezifizieren, andererseits eignen sie sich eben besonders für Untersuchungen mit grundsätzlichen pharmakologischen Zielsetzungen; infolge ihrer mannigfaltigen Substituierung weisen sie chemische und pharmakodynamische Unterschiede bei gleicher chemotherapeutischer Wirkung auf, und ihr Nachweis ist relativ einfach.

Die Verteilung der Sulfonamide in den einzelnen Blutphasen wurde bereits 1951 von WITZGALL (26) auf breiter Basis untersucht und die Ergebnisse durch viele Nachuntersucher im Grundsätzlichen bestätigt. Eine ähnliche Übersicht fehlt dagegen über die Verteilung der Sulfonamide in den Organen des Körpers. Seit der Bearbeitung dieses Themas durch EGGER (6) sind nur Einzeluntersuchungen mit recht uneinheitlichen Ergebnissen veröffentlicht worden.

Die stiefmütterliche Bearbeitung dieses Themas ist darauf zurückzuführen, daß sich die ursprünglich praktische Zielsetzung als unergiebig erwies, denn die Verteilung der Sulfonamide in den Körperorganen ist uniform. Zwar differieren die einzelnen Sulfonamide erheblich in ihrem Verteilungsvolumen, also in der Relation zwischen Blut- und Organverteilung, aber eine bevorzugte Anreicherung bestimmter Sulfonamide in bestimmten Organen konnte nicht gefunden werden. Überdies ist die Forderung nach organspezifisch gebundenen Sulfonamiden völlig überflüssig, da die Bakterien im allgemeinen extrazellulär liegen.

Der zweite Grund für die Vernachlässigung dieser Aufgabenstellung liegt in den technischen Schwierigkeiten, die bei strengen analytischen Maßstäben auftreten. Der Sulfonamidgehalt von Organen ist nur schwer zu bestimmen, da er je nach Blutgehalt oder Auswaschen des Blutes und damit auch des Gewebes in großen Dimensionen schwanken kann. Außerdem ist die chemische Sulfonamid-Bestimmungsmethode nach BRATTON und MARSHALL (4)

für exakte Gewebsbestimmungen unzureichend, denn der Sulfonamidgehalt läßt sich nur nach Eiweißfällung im Überstand erfassen, wobei auch noch schlecht zu übersehende Fehlermöglichkeiten durch das biologische Material auftreten können und Konzentrationen verwandt werden müssen, die weit über den bei therapeutischem Gebrauch üblichen liegen.

Der Sulfonamidbindung an die Organe fällt aber eine große Bedeutung vom toxikologischen Standpunkt zu. In Analogie zu der Erfahrung (26, 27), daß die haematologischen Komplikationen der Sulfonamide ihrer Erythrozyten-Affinität entsprechen, ist der Rückschluß naheliegend, daß ebenso eine starke Organbindung zu toxischen Gewebsreaktionen praedestiniert.

In den nachfolgenden Untersuchungen *) wurden die genannten technischen Schwierigkeiten umgangen, indem einerseits ³⁵S-markierte Sulfonamide angewandt wurden, andererseits isolierte Organzellen, und zwar die im Rahmen toxikologischer Betrachtungsweise am bedeutungsvollsten erscheinenden Leberzellen für in-vitro-Untersuchungen herangezogen wurden. Zwischen den isolierten Leberzellen und blutwasserähnlichen Pufferlösungen wurden Verteilungsgleichgewichte hergestellt und untersucht.

Der Untersuchungsgang selbst lehnt sich weitgehendst an die Methodik an, die WITZGALL (27, 28) zur Bestimmung der Sulfonamidbindung an Erythrozyten und Bakterien benutzt hat.

*) Herrn Dr. Horst WITZEL (Schering A.G.-Berlin) gilt besonderer Dank für die großzügige Unterstützung, die er dieser Arbeit in technischer Hinsicht zuteil werden ließ.

Allgemeine Versuchsanordnung.

- I. Es wurden Homogenate und Suspensionen von isolierten Zellen der Rattenleber hergestellt (A) und definiert (B).
- II. Das gewonnene Zellmaterial wurde mit einer sulfonamidhaltigen physiologischen NaCl-Lösung aufgeschüttelt und nach Berücksichtigung von Zeit- und Temperaturfaktoren wieder getrennt. Es wurden sechs ^{35}S -markierte Sulfonamide untersucht.
- III. Nach Trennung durch Zentrifugieren wurde der Sulfonamidgehalt im Leberzellmaterial und in der überstehenden Flüssigkeit bestimmt.

Zu I A) Eine Methode zur Gewinnung von Leberzellen der Ratte wurde von ANDERSON (2) beschrieben und von GEORGE et al (7) modifiziert.

Der Arbeitsgang zur Herstellung geeigneten Zellmaterials umfaßt:

- 1) Durchströmung des Organes in situ zur Abtrennung von Blut und Lymphe.
- 2) Auflockerung des Interstitiums durch chemische Zusätze.
- 3) Mechanische Zerkleinerung des Organes.
- 4) Abtrennung des Zellmaterials von bindegewebigen Resten und Waschung mittels Zentrifugieren, wobei je nach Methode Homogenat oder isolierte Einzelzellen gewonnen werden können.

- Zu 1) Das Verfahren der Durchströmung des Organes in situ wird, um eine ausreichende Entblutung zu erzielen, von den verschiedensten Untersuchern empfohlen (2,15,25). ANDERSON (2) prüfte verschiedene Salzlösungen hinsichtlich ihrer Eignung für die Gewinnung von Rattenleberzellen. In eigenen Versuchen wurden
- a) calciumfreie Lockelösung mit einem Zusatz von 0.011 M Aethylendiamintetraacetat als Na-Salz (Titriplex III) bei pH 7.4,
 - b) 0.85%ige NaCl-Lösung mit dem gleichen Zusatz von Titriplex III bei pH 7.4,

- c) TRIS-Pufferlösung p_H 7.4 folgender Zusammensetzung (in mmol/l) : TRIS-Puffer (p_H 7,4) 40 mmol, NaCl 88 mmol, KCl 20 mmol, $MgCl_2$ 2 mmol, KH_2PO_4 4 mmol. (21)

als Durchströmungsflüssigkeiten gewählt.

Methode: Albino-Ratten (200-220 g) wurden durch Genickbruch getötet. Nach Öffnung der Bauchhöhle wurde die V.portae freipräpariert und in das Gefäß ein Kunststoffschlauch eingeführt. Mit einem Flüssigkeitsdruck von 50 cm Wassersäule wurde das Organ in situ mit der frisch bereiteten Salzlösung durchströmt und von Blutresten weitgehend freigespült. Nach einigen Minuten war das Organ ausreichend abgeblaßt. Nach insgesamt 15 Minuten wurde das Organ excidiert, kurz abgespült und, wie unter 3) beschrieben, weiterverarbeitet.

Da mit den erstgenannten Durchströmungsflüssigkeiten eine etwa gleiche Ausbeute an Zellmaterial erzielt wurde, die dem Verfahren mit TRIS-Pufferlösung überlegen erschien, konnte zur Durchführung der Routineuntersuchungen 0.85%ige NaCl-Lösung mit 0.011 M Aethylendiamintetraacetat als Na-Salz bei p_H 7.4 gewählt werden.

Zu 2) Zur Auflockerung des Interstitiums als Voraussetzung für die Gewinnung von Einzelzellen sind verschiedene methodische Verfahren entwickelt worden. Neben Versuchen einer mechanischen Zerkleinerung (3), wie unter 3), bemühte man sich, durch chemische Zusätze eine Abtrennung von Einzelzellen zu erreichen. ANDERSON (2) beobachtete eine optimale Lockerung des interstitiellen Gewebsverbandes bei Durchströmung der Organe und Suspendierung des Zellmaterials mit Salzlösungen, denen Aethylendiamintetraacetat zugesetzt wurde. Diese Beobachtungen wurden von GEORGE et al (7) bestätigt. Nach den Vorstellungen von ANDERSON bewirkt die zugesetzte Verbindung eine Fällung von Calcium aus den leicht löslichen Calcium-Verbindungen des Zwischengewebes und damit eine Lockerung der Kittsubstanz, wodurch eine Isolierung von Einzelzellen ermöglicht würde.

Bei der Herstellung von Tumorzellsuspensionen machte sich KRAUL (14) den Spreading-effect der Hyaluronidase zunutze, um aus Gewebsbrei Einzelzellen isolieren zu können.

In eigenen Untersuchungen wurden die unter 1 a) und 1 b) angegebenen Salzlösungen geprüft. Außerdem wurden die Anregungen von KRAUL aufgegriffen und in TRIS-Pufferlösung eine fermentative Isolierung von Rattenleberzellen mittels Hyaluronidase erreicht. Die methodischen Verfahren wurden in Vergleichsuntersuchungen geprüft.

Vorversuch. Rattenleber wurde, wie in 1), durchströmt und, wie in 3), zerkleinert. Der Gewebsbrei wurde 4 Std. bei Zimmertemperatur mit 300 I.E. Kinetin inkubiert und anschließend eine 10%ige Suspension mit der Durchströmungsflüssigkeit hergestellt und, wie in 4), weiter aufgearbeitet. Als Durchströmungsflüssigkeit wurde TRIS-Pufferlösung benutzt. Analog wurden Rattenlebern, wie in 1), durchströmt mit Titriplex-haltigen Salzlösungen (1a und 1 b) und, wie in 3 und 4), weiter aufgearbeitet. Bestimmt wurde die Ausbeute an Zellen / mm³ bzw. an Sedimentvolumen/Organfeuchtgewicht.

Ergebnis:	Zellen/mm ³	Sed.Vol.	Feucht-gew.
NaCl-Lösung + Titriplex	50000	6.5ml/	15.3g
Locke-Lösung + Titriplex	46000	6.0ml/	14.5g
TRIS-Pufferlösung + Kinetin	24000	3.5ml/	15.3g

Für die Versuchsanordnung der Reihenuntersuchungen wurde 0.85%ige NaCl-Lösung mit Titriplex-Zusatz sowohl als Durchströmungsflüssigkeit wie auch als Suspensionsmedium in 2) und in 3) gewählt.

Zu 3) Eine Methode der mechanischen Bearbeitung von Gewebsmaterial zur Gewinnung von Einzelzellen gaben AUBIN und BUCHER (3) an. Sie erhielten Zellen durch Schütteln von Gewebsschnitten mit Glasperlen. ANDERSON (2) und GEORGE et al (7) benutzten Gewebspressen zur groben Zerkleinerung und passierten den Organbrei durch feinmaschige Seidenfilter in eine wässrige Suspension.

Die Verwendung von Homogenisatoren ist dagegen nur zur Gewinnung von Zellhomogenaten geeignet.

In eigenen Versuchen wurde das von Blutresten weitgehend freigespülte Organ durch eine Gewebspresse getrieben. Bindegewebige Anteile und Gefäßreste wurden zurückgehalten und verworfen. Der Organbrei wurde mit der Durchströmungsflüssigkeit suspendiert (1:10) und zur weiteren Auflockerung der noch erhaltenen Zellverbände entsprechend 2) etwa 15 Minuten vorsichtig aufgewirbelt. Anschließend wurde die Suspension durch feinstmaschige Metallsiebe (Maschenzahl $50/\text{cm}^2$ bzw. $400/\text{cm}^2$) passiert. Die Rückstände wurden verworfen. Die weitere Verarbeitung der Zellsuspension erfolgte nach 4).

Zu 4) Durch Zentrifugieren und wiederholte Aufschwemmung der Sedimente mit physiologischer NaCl-Lösung ist eine weitere Reinigung der Zellsuspension von Zelltrümmern, Erythrozyten, Gefäßresten und bindegewebigen Anteilen zu erreichen. Das zugesetzte Titriplex wird ebenfalls ausgewaschen.

Voraussetzung für die Erhaltung intakter Zellen ist ein sehr schonendes Zentrifugierverfahren. GEORGE et al (7) trennten Zellen bei einer Beschleunigung von 45 g ab.

In eigenen Versuchen wurde die nach 1) bis 3) gewonnene Zellsuspension in konischen 10 ml-Zentrifugiergläsern 5 Min bei 100 g zentrifugiert. Das Zellmaterial wurde dabei sedimentiert. Der gelblich gefärbte trübe Überstand, der hauptsächlich Zelltrümmer enthält, wurde dekantiert. Die oberste rötlich gefärbte Sedimentschicht, die vorwiegend Erythrozyten enthält, wurde abgehebert und verworfen. Das verbliebene blaßgelblich gefärbte Sediment wurde mit 0.85%iger NaCl-Lösung resuspendiert und erneut 5 Min bei 100 g zentrifugiert. Diese Waschung wurde dreimal durchgeführt. Der letzte Überstand war klar und enthielt nur noch wenig Zelltrümmer. Im Sediment fanden sich mikroskopisch ausschließlich intakte Leberzellen. Zelltrümmer waren nicht zu erkennen.

In Vorversuchen wurden die Zentrifugierbedingungen geprüft, unter denen Zellsuspensionen zu ausreichender Sedimentation zu bringen waren.

Vorversuche:

1. In konischen 10- ml- Zentrifugiergläsern wurden Suspensionen gewaschener Leberzellen bei verschiedenen Beschleunigungen zentrifugiert.

Ergebnis:

- a) bei 100 g wurde bereits nach 3 Min ein scharf abgesetztes Sediment gewonnen. Der Überstand war klar, leicht gelblich gefärbt, mikroskopisch waren nur vereinzelt Zellen oder Zelltrümmer zu erkennen. Im Sediment fanden sich reichlich intakte Zellen ohne Zelltrümmer.
 - b) Bei 700 g war das Sediment nach 3 Min mit reichlich Zelltrümmern neben intakten Zellen durchsetzt.
 - c) Bei 2200 g konnten nach 10 Min im Sediment keine intakten Zellen mehr nachgewiesen werden. Es handelte sich um dichtes Zellhomogenat.
2. Um mit hinreichend kleinen Suspensionsvolumina arbeiten zu können, wurden die Zentrifugierbedingungen in Kapillarröhrchen geprüft, die mit 1.0 ml Suspension beschickt werden konnten. Die Zellsuspensionen wurden 15 Min, 30 Min, 45 Min, 60 Min und 120 Min bei a) 100 g, b) 2200 g zentrifugiert.

Ergebnis:

- a) Das Sediment war bei 100 g erst nach 60 Min bei klarem, leicht gelblich gefärbtem, zellfreiem Überstand scharf abgesetzt. Das Sediment bestand aus intakten Zellen.
- b) Bei 2200 g war das Sediment ebenfalls erst nach 60 Min scharf abgesetzt. Das Sediment bestand bei klarem Überstand aus dichtem Zellhomogenat.

In den Reihenuntersuchungen wurden die mit Zellsuspension beschickten Kapillarröhrchen a) 60 Min bei 100 g zentrifugiert, um Sedimente intakter Zellen zu erhalten, bzw. b) 60 Min bei 2200 g geschleudert, um Sedimente von Zellhomogenaten zu gewinnen.

Zu I B.

1) Definition: Als Suspension isolierter Leberzellen wurde betrachtet, wenn mikroskopisch in der Zeiß-Thoma-Zählkammer isolierte Zellen ohne Zelltrümmer nachweisbar waren, wobei die Zellzahlen einer Packungsdichte von etwa 50000 Zellen/mm³ Sediment entsprachen. Als Zellhomogenat wurde angesehen, wenn mikroskopisch keine intakten Zellen mehr nachweisbar waren.

2) Eine Messung der Trübung von Zellsuspensionen erschien nicht ausreichend für die Definition der Suspensionen.

Versuch: Ein Sediment intakter Zellen (30000 Zellen/mm³) wurde in verschiedener Verdünnung im Spektrophotometer Unicam bei Wellenlänge 540 mμ auf Durchlässigkeit untersucht.

Ergebnis:

Sedimentverdünnung	1:10	1:100	1:200	1:2000
D %	0	30	53	89

3) Bestimmung des interzellularen Flüssigkeitsraumes von Leberzellsedimenten.

Zur Definition der Sedimente intakter Leberzellen wurde der interzelluläre Flüssigkeitsraum der Sedimente bestimmt.

a) Aus der Konzentrationsänderung einer zugesetzten Hämoglobinlösung wurde der interzelluläre Flüssigkeitsraum als Hämoglobin-Verdünnungsraum berechnet.

Hämoglobin-Lösung: Erythrozyten wurden mehrmals mit physiologischer NaCl-Lösung plasmafrei gewaschen. Nach MAIZELS und REMINGTON (17) wurde 1 Vol. Erythrozyten durch 3 Vol. H₂O haemolysiert und durch Zusatz von 43 Vol. 1.5 m NaCl-Lösung eine isotonische Lösung hergestellt. Die Zellschatten wurden scharf abzentrifugiert.

Methode: 1 ml Sediment intakter Leberzellen wurde mit 1 ml Hämoglobin-Lösung suspendiert. Bei 100 g wurden die Zellen resedimentiert. Vom Überstand wurden 0.2 ml zur Hämoglobin-Konzentrationsbestimmung entnommen.

Die Hämoglobin-Konzentration wurde nach HAVEMANN (8) bestimmt. Um störende Leerwerte auszuschließen, wurde die entnommene Hämoglobin-Lösung mit Aqua dest. auf

5.0 ml verdünnt und mit 20 ml Hämoglobin-Reagens (nach HAVEMANN) in einen Farbandsatz gebracht. Colorimetrische Bestimmung nach 10 Min in einer 10-mm-Cuvette bei 540 m μ gegen Reagentienleerwert im Spektrophotometer Unicam. In analogem Farbandsatz wurden mit der Testlösung mehrere Kurvenwerte ermittelt.

Berechnung: Die ermittelte Hämoglobin-Konzentration k wurde zur Ausgangskonzentration k₀ in Beziehung gesetzt: k₀/k = Q. Das Volumen des interzellularen Flüssigkeitsraumes beträgt

$v = v_t (Q - 1)$, wobei v_t das Volumen der zugesetzten Hämoglobin-Testlösung darstellt.

Ergebnisse:

Versuch	I	II	III
v _t (ml)	1.0	1.0	2.0
Q	1.47	1.48	1.235
v (ml)	0,47	0,48	0.47

Das Volumen des interzellularen Flüssigkeitsraumes der untersuchten Leberzellsedimente beträgt 47-48% des Sedimentvolumens.

- b) Es wurde der Gesamtwasser-Anteil von Sedimenten intakter Zellen und von Zellhomogenaten durch Trocknung bestimmt. Aus der Differenz der Gewichtsminderung wurde der interzelluläre Flüssigkeitsraum von Sedimenten intakter Zellen berechnet. Im dicht gepackten Homogenat entfällt der Begriff des interzellularen Wassers. Verbliebene Flüssigkeitsreste werden vernachlässigt.

Methode: 1.0 ml Sediment intakter Zellen wurde 30 Min. bei 2200 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das gewonnene Homogenat mit Fließpapier getrocknet. Die erhaltene Probe (I) sowie eine Vergleichsprobe (II) mit 1.0 ml Sediment intakter Zellen wurden nach Bestimmung des Feuchtgewichtes 16 Std. in einem Heraeus-Trockenapparat bei 105° C getrocknet. Bestimmt wird das Trockengewicht, Gesamtwasser und die durch Trocknung eingetretene Gewichtsminderung.

Ergebnis:

Probe	Feuchtgewicht mg	Trockengewicht mg	Ges. Wasser	Gewichtsminderung
I	1014	65	93.5%	949
II	538	67	87.5%	471

Aus der Differenz der Gewichtsminderung ergibt sich die Größe des interzellularen Flüssigkeitsraumes im Zellsediment mit 47% des Sedimentvolumens.

Zu II) Herstellung von Verteilungsgleichgewichten.

Das gewonnene Leberzellmaterial wurde mit Sulfonamid-Lösung versetzt, aufgeschüttelt und je 1 ml der Suspension in Kapillarröhrchen verteilt. Durch Zentrifugieren wurde das Zellmaterial sedimentiert. Die Bestimmung der Sulfonamid-Konzentration in Zellsediment und Überstand erfolgte nach III).

- 1.) Um eine Abhängigkeit der Verteilung von der Temperatur zu ermitteln, wurden
 - a) Versuche bei 37° C im Brutraum,
 - b) Versuche bei 22° C Zimmertemperatur angesetzt.

Ergebnis: Es waren keine wesentlichen Unterschiede der Sulfonamid-Verteilung in Abhängigkeit von der Temperatur festzustellen. Die Reihenuntersuchungen wurden deshalb bei 22° Zimmertemperatur durchgeführt.

- 2.) Um eine Abhängigkeit der Verteilung von einem Zeitfaktor zu ermitteln, erfolgte die weitere Verarbeitung 10, 20, 30 und 60 Min nach Zusatz der Sulfonamid-Lösung.

Ergebnis: Es war keine zeitliche Abhängigkeit bei der Einstellung eines endgültigen Verteilungsgleichgewichtes zu erfassen.

In den Reihenuntersuchungen erfolgte die Trennung des Zellmaterials vom Überstand 30 Min nach Zusatz der Sulfonamid-Lösung.

- 3.) Um eine Abhängigkeit der Verteilung vom Dispersionsmedium festzustellen, wurde die Vorbereitung des Zellmaterials und die Verteilung der Sulfonamide

a) in physiologischer NaCl-Lösung,

b) in Ca-freier Lockelösung

durchgeführt.

Ergebnis: Es fand sich keine unterschiedliche Verteilung der Sulfonamide in Abhängigkeit vom Dispersionsmedium. Die Reihenuntersuchungen wurden in physiologischer NaCl-Lösung durchgeführt.

4.) Es wurden Verteilungsgleichgewichte verschiedener Sulfonamide hergestellt.

Folgende Verbindungen wurden untersucht:

2-Sulfanilamido-5-methoxy-pyrimidin

= Sulfa-methoxy-diazin, Durenat ^R

2-Sulfanilamido-5-methyl-pyrimidin

= Sulfa-methyl-diazin, Pallidin ^R

2-Sulfanilamido-pyrimidin

= Sulfadiazin, Debenal ^R, Pyrimal ^R

2-Sulfanilamido -4-6- dimethyl-pyrimidin

= Sulfamethazin, Diazil ^R

2-Sulfanilamido -5- aethyl-thiodiazil, Globucid ^R

Sulfanilamid, Prontalbin ^R

Die im folgenden Text beibehaltenen Bezeichnungen sind unterstrichen.

Zu III).

A. Sulfonamid-Bestimmung.

Die radiochemische Bestimmung der Sulfonamid-Konzentration erfolgte in enger Anlehnung an WITZGALL (28). Das organisch gebundene ^{35}S wird dabei in anorganischer Form nachgewiesen.

- 1) Die Oxydation des ^{35}S wird durch Verbrennung in O_2 -Atmosphäre nach SCHÖNIGER (22) in der Modifikation nach LANGECKER (16) erreicht.
- 2) Das ^{35}S -Sulfat wird mit einem inaktiven Trägersulfat durch alkoholisches Benzidin-Reagens bei p_{H} 2,8 - 3,0 gefällt.
- 3) Die Aktivitätsbestimmung erfolgt in "unendlich dicker Schicht" im "Endfenster-Geiger-Müller-Zählrohr.

Zu 1) Nach Zentrifugieren entsprechend II) wurden die gewichtsmäßig definierten Sedimente bzw. 0,5 ml Überstand in Kegel aus aschefreien Rundfiltern gebracht, die außen mit einer dünnen Kollodiumschicht überzogen und an einem ca. 10 cm langen Palladiumdraht angebracht waren, der in einen Schliffstopfen eingeschmolzen war. In einem Gestell wurden die Schliffstopfen aufgehängt und die Proben getrocknet. In einem zugehörigen 500-ml-Schliff-Erlenmeyer-Kolben, der 5 ml 1%ige Natriumsulfat-Lösung mit einigen Tropfen Perhydrol enthielt, wurden die Filterkegel mit den getrockneten Proben im O_2 -Milieu verascht. Das enthaltene ^{35}S wird dabei in Sulfat überführt und von der vorgelegten Lösung absorbiert. Die entstandenen Peroxyde wurden durch kurzes Aufkochen entfernt.

Zu 2) Die Fällung des in der Vorlage enthaltenen Sulfates erfolgte bei p_{H} 2,8 - 3,0 nach Abkühlen in Eiswasser durch tropfenweises Einpipettieren einer alkoholischen Benzidin-Chlorid-Lösung als Benzidin-Sulfat.

Wegen seines elastischen und kohärenten Niederschlages eignet sich Benzidin-Reagens zur Fällung wesentlich besser für die weitere Verarbeitung als BaCl_2 . Die in anderen p_H -Bereichen zunehmende Löslichkeit von Benzidin-Sulfat macht eine Einstellung auf p_H 2,8 - 3,0 erforderlich.

Zu 3) In einer Filtrationsanordnung (Filterfritte aus Trovidur) wird ein Filterkuchen gewonnen, der auf einem Kunststoffschälchen in "unendlich dicker Schicht" zur Aktivitätsmessung im Endfenster-Geiger-Müller-Zählrohr geeignet ist. Es werden die Impulse/Min. gemessen.

B. Berechnung.

- 1) Um die Sulfonamid-Aufnahme aus wässrigem Milieu zu veranschaulichen, wurde der Begriff des Verteilungsquotienten eingeführt. Damit wird das Verhältnis der Sulfonamid-Menge (in Impulsen/Min.) in Sediment und Überstand beschrieben.:

Impulse/Min / 100 mg Sediment

$$\text{VQ} = \frac{\text{Impulse/Min / 100 mg Sediment}}{\text{Impulse/Min / 0.1 ml Überstand}}$$

Impulse/Min / 0.1 ml Überstand

Der Verteilungsquotient ermöglicht jedoch nur einen übersichtlichen Vergleich, der im übrigen kolloidphysikalisch unzulässig ist.

- 2) Allgemein wurde deshalb die "relative spezifische Menge" (in $\mu\text{mol/g}$) angegeben, die in Analogie zum Begriff der "spezifischen Adsorption" steht. Darunter wird die Sulfonamid-Menge (in μmol) verstanden, die mehr oder weniger in 1 g Zellmaterial nachweisbar ist, als der Gleichgewichtskonzentration entsprechen würde.

In den Reihenuntersuchungen wurde der Anteil des Zellmaterials auf 10% der Suspension eingestellt.

500 mg Zellmaterial wurde mit 4.5ml Sulfonamid-Lösung versetzt.

Nach II) wurden daraus Proben von je 1.0 ml Suspension zur weiteren Verarbeitung und Bestimmung entnommen.

Bei Gleichgewichtskonzentration wurde demnach die Zellaktivität 10 % der Gesamtaktivität der Suspension betragen. Sofern die gemessene Zellaktivität A % der Gesamtaktivität darstellt, ergibt sich bei einer Konzentration von a mg% der zugesetzten Sulfonamid-Lösung (0.9 ml) als

$$\text{Relative spezifische Menge} = (A-10) \frac{0.9 (a \text{ mg}\%) }{\text{Mol-Gewicht.}} \mu\text{mol/g}$$

3) Bei den Untersuchungen mit Sedimenten intakter Zellen wurde der Anteil des interzellularen Flüssigkeitsraumes (entsprechend I.B) bei der Berechnung berücksichtigt.

4) In der folgenden Tabelle werden die Meßdaten eines Versuches zusammengefaßt. Am Beispiel des Versuches Durenat 1 wird die Berechnung der Ergebnisse demonstriert.

a) Verteilungsquotient. (VQ)

$$VQ = \frac{\text{Impulse/ Min/ 100 mg Sediment} \quad 552}{\text{Impulse/ Min/ 0.1 ml Überstand} \quad 502} = 1.10$$

b) Relative spezifische Menge.

Zellaktivität (100 mg) = 552 Impulse/Min.

Gesamtaktivität der Suspension (1.0 ml) = 5070 Impulse/Min.

Mittlerer prozentualer Anteil der Zellaktivität von der Gesamtaktivität

$$= 10.8 \%$$

Volumen der zugesetzten Sulfonamid-Lösung (5 mg%) = 0.9 ml/1.0 ml Suspension.

MOL-Gewicht von Durenat: 280

Relat. spezif. Menge =

$$(10.8 - 10.0) \frac{0.9 \cdot 5}{280} = + 0.0128 \mu\text{mol/g}$$

Verteilungsversuch mit ^{35}S -markierten Sulfonamiden in Leberzellhomogenaten der Ratte

Sulfonamidkonzentration : 5 mg% Sulfonamid in 0.85 %iger NaCl-Lösung.

Impulse/Min.

Leber- zellen 100 mg	Über- stand 0.9ml	Über- stand 0.1ml	Gesamtak- tivität a. Suspension	Sedimentaktivität Gesamtaktivität (%)	Verteilungs- quotient	Relative spezifische Menge ($\mu\text{mol/g}$)
Durenat	552	4518	502	5070	10.9	1.10
	543	4725	525	5268	10.3	1.04
	584	4554	506	5138	11.3	1.16
		Mittlere Ergebnisse:		10.8	1.10	+ 0.0128
Sulfanil- amid	254	2214	246	2468	10.3	1.02
	281	2160	240	2441	11.5	1.17
	262	2232	248	2494	10.5	1.05
		Mittlere Ergebnisse:		10.8	1.08	+ 0.0209
Globucid	211	1305	145	1516	13.9	1.44
	192	1242	138	1434	13.4	1.38
	205	1251	139	1456	14.0	1.47
		Mittlere Ergebnisse:		13.8	1.43	+ 0.0602
Pallidin	195	1485	165	1680	11.6	1.18
	208	1566	174	1774	11.8	1.19
	179	1476	164	1655	10.8	1.09
		Mittlere Ergebnisse:		11.4	1.15	+ 0.0239

Verteilungsversuch mit ^{35}S -markierten Sulfonamiden in Leberzellhomogenaten der Ratte.

Sulfonamidkonzentration: 5 mg% Sulfonamid in 0.85%iger NaCl-Lösung.

Impulse/Min.

Leber- über- über- Gesamtakti- Sedimentakti- Verteilungs- Relative
zellen stand stand vität der vität (%) quotient spezifische
100 mg 0.9 ml 0.1 ml Suspension Gesamtaktivität Menge ($\mu\text{mol/g}$)

- 17 -

Sulfadiazin	208	1647	183	1855	11.2	1.13	+ 0.0162
	216	1818	202	2034	10.6	1.06	
	194	1603	178	1797	10.8	1.09	
	Mittlere Ergebniss:				10.9	1.09	
Sulfa- methazin	679	5229	581	5908	11.4	1.17	+ 0.0255
	699	5229	581	5928	11.7	1.20	
	705	5238	582	5943	11.8	1.21	
	Mittlere Ergebnisse:				11.6	1.19	

Verteilungsversuche mit ^{35}S -markierten Sulfonamiden.

1. Vergleich zwischen der Sulfonamid-Aufnahme in isolierten Leberzellen und im Leberzellhomogenat der Ratte.

Sedimente isolierter Leberzellen der Ratte (50 000 Zellen/mm³) und Homogenate der Rattenleber wurden mit 2.5%igen Sulfonamidlösungen versetzt.

Relative spezifische Menge ($\mu\text{mol/g}$) in Leberzellen und Leberzellhomogenat bei 2.5 mg%iger Sulfonamid-Konzentration.

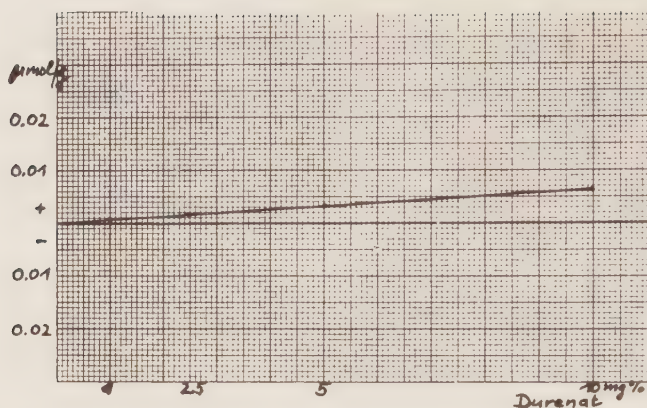
	Durenat	Sulfadiazin	Sulfanilamid	Globucid
Leberzellen	+ 0,001	+ 0.004	+ 0.042	+ 0.013
Leberzellhomogenat	+ 0,002	+ 0.003	+ 0.013	+ 0.015

Ergebnis: Die Sulfonamid-Aufnahme in Zellen und Homogenaten der Rattenleber verlief in gleicher Größenordnung. In mehreren Einzeluntersuchungen war dieses Ergebnis zu bestätigen.

Zur Durchführung von Reihenuntersuchungen wurde deshalb das einfacher zu bearbeitende Homogenat als Substrat gewählt.

2. Abhängigkeit der Sulfonamid-Aufnahme von der Gleichgewichtskonzentration.

Zellhomogenate der Rattenleber wurden mit Durenat in steigender Konzentration versetzt.

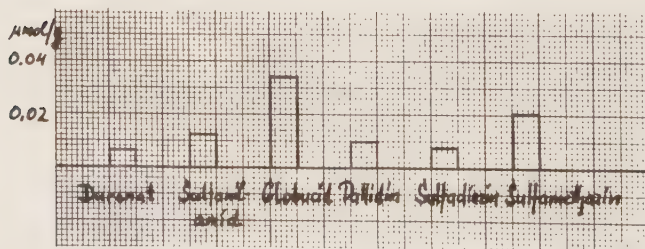


Die graphische Darstellung veranschaulicht, daß die Verteilung von Durenat dem Nernst'schen Verteilungssatz (20) folgt. Es findet sich keine Abweichung im Sinne der FREUNDLICH'schen Adsorptionsisotherme. Die Verteilung zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration.

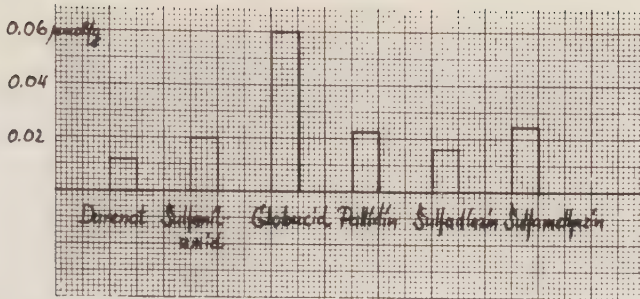
3. Vergleich der Aufnahme verschiedener Sulfonamide bei gleicher Konzentration im Zellmaterial der Rattenleber.

Um methodische Schwankungen an verschiedenen Tagen auszuschließen, wurden im gleichen Arbeitsgang Homogenate mit verschiedenen Sulfonamiden versetzt. Als Konzentrationen wurden gewählt

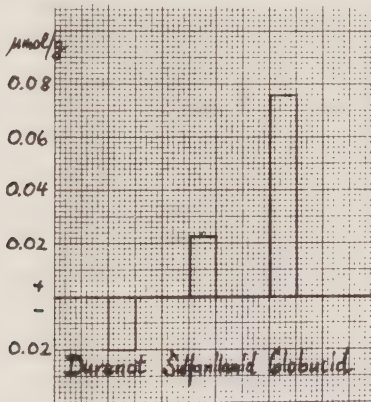
- 2.5 mg%,
- 5 mg% Sulfonamid in physiologischer NaCl-Lösung.



- Relative spezifische Menge (μmol/g) bei 2.5 mg%iger Sulfonamid-Konzentration



- b) Relative spezifische Menge ($\mu\text{mol/g}$) bei 5 mg%iger Sulfonamid-Konzentration
- c) In analoger Weise wurden isolierte Leberzellen der Ratte mit 5 mg%igen Sulfonamid-Lösungen versetzt.



- d) Relative spezifische Menge ($\mu\text{mol/g}$) in isolierten Leberzellen der Ratte bei 5 mg%iger Sulfonamid-Konzentration.

Ergebnis: Die Sulfonamid-Aufnahme bleibt in der Größenordnung der Gleichgewichtskonzentration. Bei sämtlichen untersuchten Verbindungen liegt die Aufnahme gering über der Gleichgewichtskonzentration, nur bei Durenat ergaben sich auch negative Werte. Die Sulfonamid-aufnahme variiert nur wenig bei den einzelnen Sulfonamiden.

Diskussion.

- 1.) Die Sulfonamid-Aufnahme der Leberzellen ist, wie die Vorversuche unter II. 1) (S. 11) zeigen, weitgehend unabhängig von der Temperatur. Das entspricht den Ergebnissen der Untersuchungen WITZGALLS (27, 28) über die Sulfonamid-Aufnahme in Bakterien und Erythrozyten, während er bei der Bindung an Plasma-Eiweiß dagegen einen Temperaturkoeffizienten von $Q_{10} = 1.2$ fand.
In diesem Zusammenhang sind auch die Arbeiten von ANAND et al (1) über die Streptomycin-Aufnahme von E. coli und die Untersuchungen von EAGLE (5) über Bindung von Penicillin an Bakterien interessant. Während die Streptomycin-Aufnahme in E. coli ebenfalls keine Temperaturabhängigkeit zeigte, fand EAGLE bei niedrigen Temperaturen ($2^{\circ} - 5^{\circ} \text{C}$) eine geringere Penicillinbindung an Bakterien als bei 37°C .
Ein Zeitfaktor für den Verteilungsvorgang konnte mit der trägen Methode des Zentrifugierens nicht erfaßt werden. Das entspricht den Ergebnissen von WITZGALL (26, 27) beim Studium der Verteilungsprobleme an Erythrozyten. Die untersuchten Sulfonamide überwinden die Erythrozyten-Membran so schnell, daß die für die Trennung notwendige Zentrifugierzeit die Einstellung des Verteilungsgewichtes nicht erfassen läßt. Allerdings galt das nicht für stark im Blutwasser gelöste Sulfonamide wie Albucid und Euvernil. Sie zeigen eine zeitliche Abhängigkeit bei der Membranpassage. Leider konnten diese Verbindungen aus technischen Gründen nicht in die hier vorliegenden Untersuchungen einbezogen werden.
Auch bei der Verteilung in Bakterien konnte WITZGALL (28) keinen Zeitfaktor ermitteln.
- 2.) Die von den Leberzellen aufgenommene Sulfonamid-Menge ist gegenüber den Organbestimmungen in der Literatur erstaunlich gering. Zur näheren Veranschaulichung könnte man den Vergleich der Konzentrationen, der allerdings nach kolloidphysikalischen Gesichtspunkten nicht statthaft ist, heranziehen. Der Sulfonamidgehalt der Leberzellen liegt

demzufolge in der Größenordnung der wäßrigen Gleichgewichtskonzentration, d. h. im Körper entspricht der Sulfonamid-Gehalt der Leberzellen ungefähr der Konzentration im Blutwasser. Diese niedrige Sulfonamid-Bindung der Leberzellen steht im auffallenden Widerspruch zu den weiter unten erwähnten Untersuchungen des Sulfonamidgehaltes der Leber in vivo.

Es drängt sich deshalb die Frage auf, ob in den eigenen Untersuchungen methodische Fehler vorliegen.

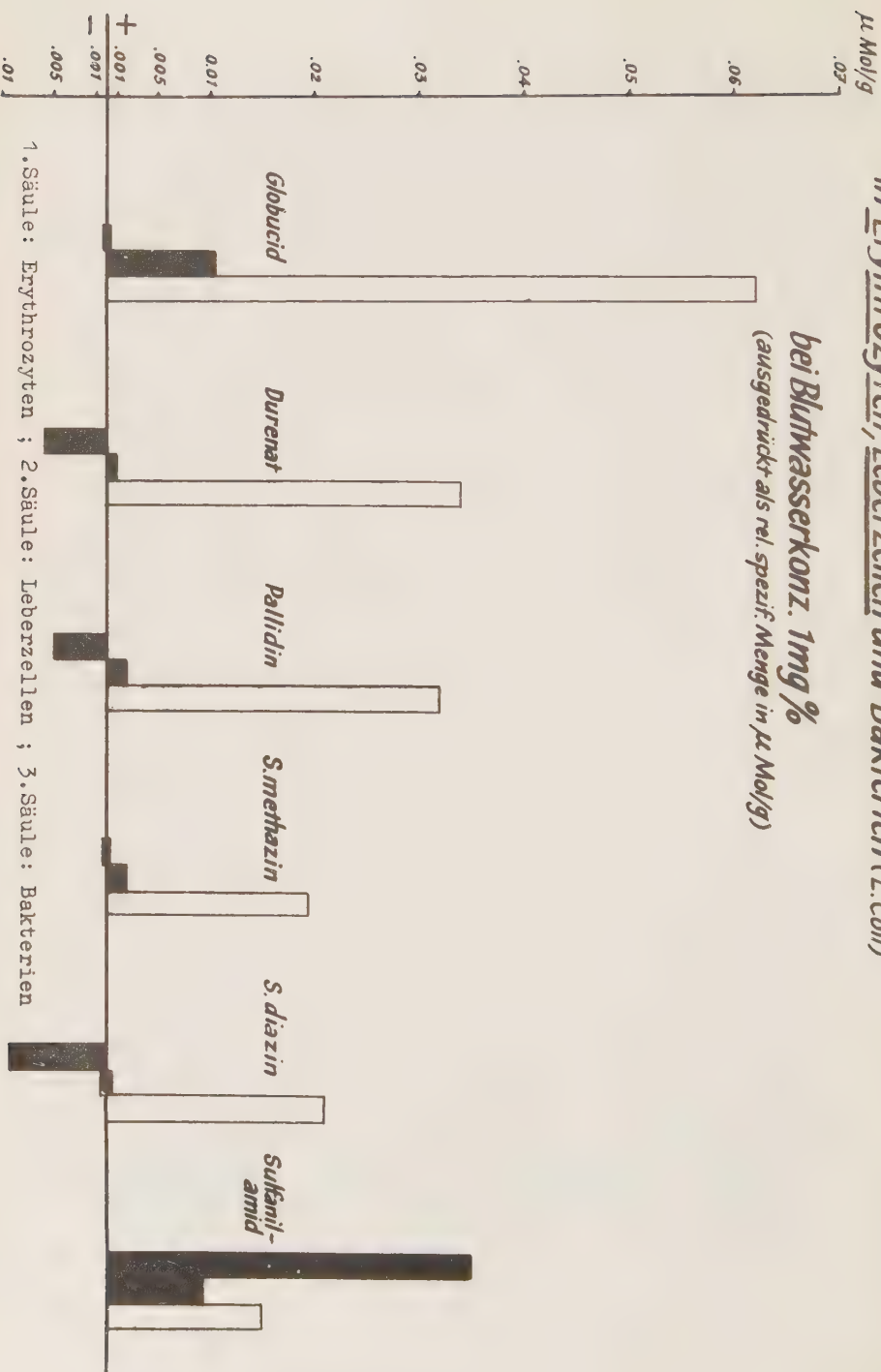
- a) Die Versuchsanordnung wurde weitgehend der von WITZGALL und BOYEMS (28) benutzten Methodik angepaßt, mit der die Sulfonamid-Aufnahme in Bakterien und Erythrozyten untersucht wurde. In einer vergleichenden Abbildung werden die Ergebnisse dieser Arbeiten und der eigenen Untersuchungen zusammen gestellt. Es zeigt sich, daß einerseits deutliche Unterschiede zwischen dem Sulfonamid-Gehalt der Leberzellen und der Bakterien bestehen, andererseits aber auch der Sulfonamid-Gehalt der Erythrozyten in der Nähe der Gleichgewichtskonzentration liegt.

Das Verhalten der Sulfonamide bei der Verteilung in Erythrozyten ist von WITZGALL mit der chemischen Methode überprüft und außerdem rechnerisch aus der Differenz von Vollblut- und Plasma-Spiegel bestätigt worden. Die Verteilung einiger Sulfonamide wurde von WITZGALL (26) in NaCl-Erythrozyten-Suspensionen und von HECHT (9) in Ringer-Erythrozyten-Suspensionen untersucht. Dabei fanden sich Verteilungsquotienten, die den eigenen Untersuchungen mit Leberzellen größenordnungsmäßig entsprachen. Lediglich Sulfanilamid zeichnet sich durch eine hohe Erythrozytenbindung aus. In der folgenden Tabelle werden die von WITZGALL (26) und HECHT (9) ermittelten Verteilungsquotienten einiger Sulfonamide in Erythrozyten-Suspensionen den eigenen Untersuchungsergebnissen mit Leberzellmaterial der Ratte gegenübergestellt.

Verteilung von Sulfonamiden

in Erythrozyten, Leberzellen und Bakterien (E. Coli)

bei Blutwasserkonz. 1mg %
(ausgedrückt als rel. spezif. Menge in μ Mol/g)



1. Säule: Erythrozyten ; 2. Säule: Leberzellen ; 3. Säule: Bakterien

Verteilungsquotienten

	<u>Erythrozyten</u>	<u>Leberzellhomogenat</u>	<u>Leberzellen</u>
	NaCl (10mg%)	NaCl (5mg%)	NaCl (2.5mg%)
Sulfanilamid	2.0 (26)	1.1	1.2
Globucid	1.0 (26)	1.4	1.1
Sulfadiazin	0.9 (26)	1.1	1.0
Durenat	0.6 (9)	0.9	1.0
Sulfamethazin	1.4 (26)	1.2	0.9

Die Größenordnung der Sulfonamid-Aufnahme in Erythrozyten ist weitgehend gesichert. Da auch die Verteilung in Leberzellen zu entsprechenden Ergebnissen geführt hat, kann der Analogieschluß gezogen werden, daß das Verhalten der Sulfonamide bei der Verteilung in Leberzellen methodisch ausreichend erfaßt werden konnte.

Eine wesentliche Vorbedingung für eine einwandfreie Versuchsanordnung ist die Wahl eines geeigneten Dispersionsmediums. SCHOLTAN (23) und WILZGALL (28) haben darauf hingewiesen, daß Pufferlösungen die Bindungsverhältnisse entscheidend beeinflussen können. So ist Phosphatpuffer nach SØRENSEN ungeeignet, während physiologische NaCl-Lösung für derartige Verteilungsuntersuchungen brauchbar erscheint. Die eigenen Untersuchungen wurden deshalb in physiologischer NaCl-Lösung durchgeführt.

b) Welche Größenordnung der Sulfonamid-Verteilung wäre zu erwarten?

Die Verteilung körperfremder Stoffe im Organismus kann allgemein ausgedrückt werden durch die fiktive Größe des relativen Verteilungsvolumens, die das Verhältnis der im Körper vorhandenen Menge des körperfremden Stoffes (mg/g Körpergewicht) zu seiner Konzentration im Blut bzw. Serum (mg/ml) summarisch beschreibt.

Vom kolloidphysikalischen Standpunkt erscheint es jedoch zweckmäßiger, zum Bezugssystem nicht die Vollblutkonzentration sondern die Gleichgewichtskonzentration, die der

Blutwasserkonzentration entspricht, zu wählen.

Die in der Literatur angegebenen relativen Verteilungsvolumina für einige Sulfonamide (Zusammenstellung bei KIMBEL (13)) wurden deshalb nach den von WITZGALL (26) angegebenen Serum-Blutwasser-Quotienten auf die entsprechenden Blutwasserkonzentrationen umgerechnet. Die artspezifisch unterschiedliche Plasmabindungsfähigkeit tierischer Seren blieb bei der Berechnung unberücksichtigt. In der folgenden Tabelle werden die berechneten Proportionalitätsfaktoren mit den experimentell ermittelten Verteilungsquotienten im Leberzellmaterial der Ratte verglichen.

Verbindung	relatives Vert. Volumen	Species	Blut-Wasser-Konz.errechnet mg%	Körper-Gehalt Wasser-Konz.	Verteilungs-Quotienten, eigene Untersuchung
Globucid	35%	Hund	7.9	1.3	1.4 '')
	46%	Hund	2.7	0.9	1.1 ')
Sulfadiazin	47%	Ratte	1.1	0.9	1.1 '')
	65%	Ratte	11.2	0.9	
Sulfanilamid	70%	Hund	5.4	1.5	1.1 '')
Pallidin	40%	Ratte	1.5	0.7	1.1 ')
	49%	Ratte	12.0	0.8	1.1 '')
Durenat	35%	Ratte	0.9	1.1	1.1 ')
	66%	Ratte	9.0	1.1	1.1 '')

') bei 2.5 mg% ' ') bei 5 mg%.

Die Werte zeigen ungefähr Übereinstimmung. Die Verteilung in der Rattenleber kann eine Vorstellung von der Verteilung der Sulfonamide im Organismus vermitteln, sofern als Grundlage der vergleichenden Betrachtung die Blutwasserkonzentration gewählt wird.

- c) Die eigenen Untersuchungsergebnisse zeigen keine Übereinstimmung mit den in der Literatur mitgeteilten Ergebnissen von Gewebsbestimmungen verschiedener Sulfonamide. Die Arbeiten über die Gewebsverteilung der herkömmlichen

Sulfonamide wurden von EGGER (6) zusammenfassend referiert. Die Sulfonamid-Gehalte einzelner Organe wurden sehr unterschiedlich angegeben, eine Speicherung wird allgemein abgelehnt.

JANBON et al (12) vertreten jedoch die Auffassung, daß die Leber Sulfonamid-Verbindungen (z. B. Sulfapyridin) aktiv festhält und deshalb höhere Konzentrationen aufweise als dem Blutspiegel entsprechen würde. Verschiedene Untersucher (nach 6) fanden in der Leber ebenfalls höhere Sulfonamid-Spiegel als im Blut, so bei Sulfathiazol und Sulfapyridin. EGGER (6) bestimmte den Lebergehalt von Cibazol in der Größenordnung des Blutspiegels.

Teilweise werden die Organgehalte auch niedriger als im Blut angegeben, so bei Sulfadiazin, Irgafen und Elkosin. In neueren Untersuchungen mit den modernen Langzeit-Sulfonamiden ergaben sich ähnliche Verhältnisse. Aber auch dann würden die angegebenen Werte bedeuten, daß der Gewebsspiegel um ein Vielfaches höher liegt, als hier der Blutwasserkonzentration entspricht.

HEPDING (10) fand in der Rattenleber 1.0 mg% Pallidin bei einem Vollblutspiegel von 4.6 mg%. HECHT et al (9) bestimmten in der Rattenleber 14.2 mg%. Pallidin bei einer Vollblutkonzentration von 8.1 mg%; der Organgehalt an Durenat betrug 12.3 mg% bei 9.2 mg% im Blut. Auch KIMBEL und GARN (13) fanden in den verschiedenen Organen der Ratte Durenat-Konzentrationen, die dem Vollblutspiegel annähernd entsprachen. Vergleichende Untersuchungen von NEIPP et al (18, 19) mit Aristamid, Lederkyn, Orisul und S-chlorpyridazin zeigten ähnliche Relationen des Gehaltes in Leber und Blut bei der Maus. SCHMID et al (24) berichten über die Gewebsverteilung von ^{35}S -markiertem Orisul bei der Maus; sie fanden in der Leber eine signifikant höhere Aktivität als im Blut.

Die experimentellen Bedingungen der Gewebsbestimmung von Sulfonamiden sind bei den einzelnen Autoren jedoch derart unterschiedlich, daß eine vergleichende Bewertung ausgeschlossen erscheint (18).

Hinzu kommt, daß die bestimmten Organgehalte auf Blut- oder Serumkonzentrationen bezogen werden. In neueren Arbeiten wird von WITZGALL (26, 27, 28) als Grundlage von Verteilungsberechnungen aber die Blutwasserkonzentration vorgezogen. Prinzipiell ist die Bestimmung von Verteilungsgleichgewichten, die auf Organuntersuchungen basieren, durch methodische Schwierigkeiten belastet.

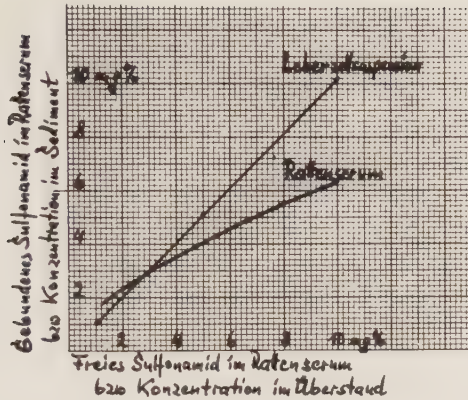
- 1.) Das zu untersuchende Organ muß entblutet werden. Dabei wird ein Teil der Sulfonamid-Verbindung bereits wieder aus dem Gewebe ausgewaschen, da keine irreversiblen Bindungen vorliegen.
- 2.) Eine direkte Gewebsbestimmung, bei der auf eine vorherige Entblutung verzichtet wurde, ist durch die Erfassung des Sulfonamidgehaltes im Blut belastet und vermittelt völlig falsche Vorstellungen.

Die Ergebnisse derartiger Untersuchungen können deshalb nicht als verbindlich angesehen werden.

Bei den zitierten Autoren ist doch wohl der Blut- oder Plasma-gehalt mitbestimmt worden, denn die ermittelten Sulfonamidkonzentrationen sind etwa 5. - 10 mal so hoch wie in den hier vorliegenden Ergebnissen.

- 3.) Die Sulfonamid-Aufnahme im Leberzellmaterial der Ratte folgt dem Nernst'schen Verteilungssatz (20). Der im Zellmaterial gefundene Sulfonamid-Gehalt steht in linearer Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration. In höheren Konzentrationsbereichen hat sich kein Umschlagpunkt finden lassen, der einen Übergang in eine Adsorptionsisotherme anzeigt, wie sie für die Bindung der Sulfonamide an Plasmaprotein charakteristisch ist.

Das besagt: Die Sulfonamid-Anteile der Zellphase und in der wäßrigen Suspensionsphase verhalten sich zueinander wie molekulare Sulfonamid-Lösungen in verschiedenen Lösungsmitteln.



Verteilung von Durenat im Serum der Ratte (nach SCHOLTAN) (23) und in Suspensionen von Leberzell-homogenat der Ratte.

Diese Befunde entsprechen dem Ergebnis analoger Verteilungsversuche mit Erythrozyten- und Bakterien-Suspensionen (27, 28). Auch in diesen Versuchen zeigte sich, daß die Verteilung der Sulfonamide dem Nernst'schen Verteilungssatz folgt. Dieses Ergebnis erschien insofern auffällig, als ursprünglich eine Adsorption der Sulfonamide im Gewebe erwartet wurde.

Eine Erklärung für diese Beobachtung kann hier nicht gegeben werden. Jedoch kann ein interessanter Diskussionspunkt aufgrund eigener Versuche zu dieser Frage beige-steuert werden. Der Nernst'sche Verteilungssatz besagt, daß sich die Sulfonamid-Anteile beider Phasen wie zwei Lösungen zueinander verhalten. Es liegt nahe, bei der Aufrechterhaltung der Lösungsgleichgewichte die Mitwirkung von Membran-potentialen zu vermuten. In eigenen Vergleichsuntersuchungen (S. 18) zeigen sich jedoch keine wesentlichen Abweichungen bei der Verteilung in Zellhomogenaten und in intakten Zellen. Eine selektive Membranwirkung erscheint demzufolge unwahrscheinlich.

- 4.) In der Geschichte der Sulfonamid-Forschung waren die ersten hochwirksamen Verbindungen durch toxische Nebenwirkungen

schwer belastet und wurden deshalb aufgegeben. Im Vordergrund standen neben Nerven- und Leberschädigungen vor allem Blut-erkrankungen. Die von HEUBNER 1942 (11) aufgestellte Toxizitätsreihe der damals bekannten Sulfonamide (Reihenfolge der abnehmenden Toxizität: Sulfanilamid $\longrightarrow$ (Prontosil^R, Uliron^R) $\longrightarrow$ Sulfapyridin $\longrightarrow$ Sulfathiazol $\longrightarrow$ Sulfadiazin und Derivate) entspricht der experimentell zu bestätigenden Reihe der Erythrozyten-Bindung und, wie WITZGALL (26) schon 1951 ausführte, wahrscheinlich auch der Organzellbindung.

Die heutigen Sulfonamide sind praktisch frei von echten toxischen Komplikationen im hämopoetischen System wie im Nerven- und Lebergewebe. Die eigenen Untersuchungsergebnisse sind eine experimentelle Bestätigung dieser empirischen Feststellung. Die vier Verbindungen der 2-Sulfanilamidopyrimidin-Gruppe sowie Globucid zeigen eine besonders günstige Relation der Bindung an Bakterien, Leberzellen und Erythrozyten. Der etwas höheren Globucid-Verteilung ist keine praktische Bedeutung beizumessen, da bei dieser stark plasmagebundenen Verbindung die Blutwasserkonzentration bei therapeutischem Blutspiegel entsprechend geringer ist, und die effektive Organanreicherung sich infolgedessen den anderen Sulfonamiden angleicht. Leider konnte aus technischen Gründen von den älteren Sulfonamiden nur Sulfanilamid untersucht werden. Aber gerade diese Verbindung zeigt neben der bekannten hohen Erythrozyten-Affinität auch eine im Vergleich zur Bakterienbindung ungünstig hohe Leberverteilung. Die neueren Sulfonamide wie Durenat und Pallidin bieten dagegen ein unauffälliges und monotones Bild. Es bestätigt, daß diese Verbindungen vom toxikologischen Standpunkt den älteren Sulfonamiden wesentlich überlegen sein müssen.

Das Verhältnis der Verteilung in den Leberzellen, Erythrozyten (27) und Bakterien (28) kann durch Relationszahlen ausgedrückt werden, wie sie in der folgenden Tabelle aufgeführt sind. Als Bezugsgröße wird der Sulfonamidgehalt in Erythrozyten gewählt.

Relation	Erythrozyten:		Leberzellen:		Bakterien:
Durenat	1	:	1,2	:	2,3
Pallidin	1	:	1,2	:	2,2
Sulfadiazin	1	:	1,3	:	2,0
Sulfamethazin	1	:	1,1	:	1,5
Globucid	1	:	1,3	:	2,7
Sulfanilamid	1	:	0,7	:	0,8

Wenn die haematologischen Komplikationen der früheren Sulfonamide ihrer Erythrozyten-Affinität entsprechen, so ist auch eine Prüfung der Organbindung bei allen neueren Verbindungen der Sulfonamid-Gruppe wichtig, um analoge toxische Gewebsreaktionen zu vermeiden. Die chemotherapeutische Wirkung der Sulfonamide ist auf die Bakterien gerichtet und mit der Bindung an die Bakterien verknüpft. Diese Wirkung kann aber nur dann voll zur Geltung kommen, wenn nicht andere Adsorbentien konkurrieren oder eine Affinität zu Organzellen toxische Nebenwirkungen verursacht.

Die lapidare Aussage EHRLICHS "Corpora non agunt nisi fixata" gewinnt auch in dieser Beziehung lebendige Bedeutung.

Die experimentell bestimmbare Relation der Sulfonamidbindung an Bakterien, Erythrozyten und Leberzellen bietet eine wertvolle experimentelle Unterlage für Toxizitätsprüfungen von Sulfonamiden. Sie ermöglicht eine Beurteilung, in welchem Ausmaß toxische Wirkungen auf Organzellen und Erythrozyten im Vergleich zur Bakterien-Affinität zu erwarten sind. Die Methode einer Bestimmung der Bindung an Organzellen wird hier erstmalig vorgelegt. Ebenso wie die Erfassung der Bakterien- und Erythrozyten-Affinität sollte die Bestimmung der Organzellbindung von Chemotherapeutika Bestandteil pharmakologischer Untersuchungen werden.

Zusammenfassung.

Es wurden Verteilungsstudien mit verschiedenen ^{35}S -markierten Sulfonamiden in Suspensionen intakter Leberzellen und Leberzellhomogenaten der Ratte durchgeführt. Zur Gewinnung geeigneten Zellmaterials wurden verschiedene Methoden erprobt. Am zweckmäßigsten erwies sich die Durchströmung der Rattenleber in situ mit physiologischer NaCl-Lösung, der Aethyldiamintetraacetat zugesetzt war. Nach anschließender mechanischer Zerkleinerung des Organes durch eine Gewebspresse und Filtration durch feinmaschige Metallsiebe konnte durch schonendes Zentrifugieren aus den gewonnenen Suspensionen das Zellmaterial zur Sedimentation gebracht werden. Die überstehenden Blutreste wurden abgetrennt und verworfen. Nach Herstellung eines Verteilungsgleichgewichtes von ^{35}S -markierten Sulfonamiden in physiologischer NaCl-Lösung und Leberzellen der Ratte erfolgte die Bestimmung der Aktivitäten im Zellmaterial und wässrigen Überstand, die durch Zentrifugieren getrennt wurden. Der Nachweis des organisch gebundenen ^{35}S erfolgte nach Überführung in die anorganische Form. Die Ergebnisse der Messungen im Endfenster-Geiger-Müller-Zählrohr wurden als Verteilungsquotienten und als relative spezifische Menge (in $\mu\text{mol/g}$) in den Leberzellen ausgedrückt.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

- 1.) Die untersuchten ^{35}S -markierten Sulfonamide werden von den Leberzellen der Ratte aufgenommen. Quantitativ entspricht die aufgenommene Sulfonamidmenge jedoch nicht den Organbestimmungen der Literatur, die mit dem Plasmaspiegel korrelieren, sondern die Aufnahme der untersuchten Sulfonamide erfolgt in Höhe der wässrigen Gleichgewichtskonzentration, die der Blutwasserkonzentration entspricht.

Die Fehler der Organbestimmungen von Sulfonamiden in der Literatur werden diskutiert.

- 2.) Die Verteilung der Sulfonamide folgt, wie Konzentrationsuntersuchungen zeigen, dem Nernst'schen Verteilungssatz. Während das Verhalten der Sulfonamide gegenüber Plasma-eiweiß

durch die FREUNDLICH'sche Adsorptionsisotherme beschrieben werden kann, findet die Aufnahme der Sulfonamide in Leberzellen in linearer Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration statt. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen, die WITZGALL bei der Verteilung von Sulfonamiden in Erythrozyten und Bakterien erhalten konnte.

Die Bedeutung dieses Untersuchungsergebnisses wird diskutiert. Insbesondere wird eine Membranwirkung bei der Verteilung in Leberzellen für unwahrscheinlich gehalten, da sich die Sulfonamidaufnahme in intakten Leberzellen und in Leberzellhomogenaten größenordnungsmäßig entspricht.

3.) Es wurden folgende Sulfonamide untersucht:

Durenat, Pallidin, Sulfadiazin, Sulfamethazin, Globucid, Sulfanilamid.

Die einzelnen Sulfonamide zeigen bei der Verteilung kein unterschiedliches Verhalten. Lediglich das besonders erythrozyten-affine Sulfanilamid wird auch von Leberzellen etwas stärker aufgenommen.

Die Bedeutung der Untersuchungsergebnisse für toxikologische Fragen wird diskutiert.

Die haematologischen Nebenwirkungen der früheren Sulfonamide korrelieren mit ihrer Erythrozyten-Affinität.

Toxische Gewebsreaktionen sind bei entsprechender Organzellbindung zu erwarten. Um die therapeutische Wirksamkeit von Chemotherapeutika im Verhältnis zu ihrer Toxizität abschätzen zu können, erscheint die Bestimmung der Bindung dieser Arzneimittel an Bakterien, Erythrozyten und Leberzellen wichtig. Die Relation dieser Bindungsverhältnisse bietet eine wertvolle experimentelle Unterlage für toxikologische Beurteilungen. Die hier vorgelegte Methode zur Bestimmung der Organzellbindung von Sulfonamiden sollte deshalb im Rahmen pharmakologischer Untersuchungen von Chemotherapeutika Anwendung finden.

Literaturverzeichnis

- 1) Anand, N; B.D. Davis; A.K. Armitage.
"Uptake of Streptomycin by E. coli."
Nature 185 (1960), 23-24
- 2) Anderson, N.G.
"The Mass Isolation of Whole Cells from Rat Liver"
Science 117 (1953), 627-628
- 3) Aubin, P.M.G.S. and N.L. R.Bucher: Anat.Rec.112, 797 (1952)
zit. nach Lang, K. und G. Siebert: "Aufarbeitung von
Geweben und Zellen" in Hoppe-Seyler/Thierfelder,
handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemi-
schen Analyse, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-
Heidelberg 1955, 10. Auflage, II. Band. S. 548
- 4) Bratton, A.C. and E.K. Marshall jr.
"A new coupling component for Sulfanilamide determi-
nation"
The Journal of Biological Chemistry 128,
537-550 (1939)
- 5) Eagle, H.
"The Binding of Penicillin in Relation to its Cyto-
toxic Action"
The Journal of Experimental Medicin., 99
(1954), 207-226
- 6) Egger, P.
"Die Verteilung der Sulfonamide im Organismus."
Benno Schwabe & Co., Verlag Basel, 1946
- 7) George, S.St., M. Friedmann, S.O. Byers
"Mass Separation of Reticuloendothelial and Parenchymal
Cells of Rat's Liver"
Science 120 (1954), 463-464
- 8) Havemann, R.
"Die Bestimmung von Haemoglobin mit dem lichtelektri-
schen Colorimeter"
Klinische Wochenschrift 19 (1940) 503-505

- 9) Hecht, G., K. Junkmann, H. Langecker, Ch. Gloxhuber,
A. Harwart und S. Wirtz
"Pharmakologie des 2-Sulfanilamido- 5 methoxy-
pyrimidins"
Arzneimittelforschung, 11 (1961) 695-700
- 10) Hepding, L., A. Hoffmann und H. Wahlig
"Experimentelle Untersuchungen über 2-Sulfanilamido-
5-methyl-pyrimidin"
Arzneimittel-Forschung 10 (1960) 440-448
- 11) Heubner, W.
"Toxikologie der Sulfonamide"
Deutsche Medizinische Wochenschrift 69
(1943) 385
- 12) Janbon, Chaptal und Lazerges: Presse méd. 1942, II, 507
zit. nach Egger, P.: Die Verteilung der Sulfonamide
im Organismus, Benno Schwabe-Verlag Basel 1946.
- 13) Kimbel, K.H., F.W. Garn
"Verbleib und Ausscheidung von Depot-Sulfonamiden"
Arzneimittel-Forschung 11 (1961), 721-726
- 14) Kraul, M.A.
"Tumorverimpfung unter Zusatz von Hyaluronidase"
Die Naturwissenschaften 42 (1955), 587
- 15) Lang, K. und G. Siebert
"Aufarbeitung von Geweben und Zellen"
in Hoppe-Seyler/Tnierzfelder, Handbuch der
physiologisch- und pathologisch-chemischen
Analyse, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-
Heidelberg, 1955, 10. Auflage, II.Band S. 562
- 16) Langecker, H.
"Die Verbrennung von Körperflüssigkeiten in Sauer-
stoffatmosphäre und ihre Anwendung zur Jodbestimmung
in kontrastmittelhaltigen Flüssigkeiten"
Klinische Wochenschrift 37 (1959) 471-472

- 17) Maizels, M. and Mary Remington
"Percentage of intercellular medium in human Erythrocytes centrifuged from albumin and other media"
The Journal of Physiology 145 (1959) 658-666
- 18) Neipp, L., W. Sackmann and J. Tripod
"Some new trends in the field of experimental research on sulfonamides"
Antibiotica et Chemotherapia 9 (1961), 19
- 19) Neipp, L., Padowetz W., W. Sackmann, J. Tripod
"Experimentelle Untersuchungen über neue Sulfonamid-Derivate unter besonderer Berücksichtigung der Beziehungen zwischen Blutkonzentration, Intensität und Dauer der Heilwirkung"
Schweizerische medizinische Wochenschrift 88 (1958) 835-839
- 20) Nernst, W.
"Theoretische Chemie vom Standpunkt der Avogadro-schen Lehre und der Thermodynamik"
Verlag Ferdinand Enke Stuttgart 1913
(7. Auflage).
- 21) Rose, I.A.
"The Use of Kinetic Isotope Effects in the Study of Metabolic Control"
The Journal of Biological Chemistry 236 (1961) 603-609
- 22) Schöniger, W.
"Eine mikroanalytische Schnellbestimmung von Halogen in organischen Substanzen"
Mikrochimica Acta (Wien) 1955, 123-129
"Die mikroanalytische Schnellbestimmung von Halogenen und Schwefel in organischen Verbindungen"
Mikrochimica Acta (Wien) 1956, 869-876
- 23) Scholtan, W.
"Die Bindung der Langzeit-Sulfonamide an die Eiweißkörper des Serums"
Arzneimittel-Forschung, 11 (1961) 707-720

- 24) Schmid, K. J. Tripod und F. Gross
"Vergleichende radiochemische und colorimetrische
Bestimmung der Blut- und Gewebeskonzentration von
Sulfaphenazol (Orisul)
Klinische Wochenschrift 38 (1960) 862-866
- 25) Wilbur, K. M. and N.G. Anderson: Exp. Cell. Res. 2,47 (1951)
zit. nach Lang, K. und G. Siebert: "Aufarbeitung von
Gewebe und Zellen" in Hoppe-Seyler/Thierfelder,
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemi-
schen Analyse, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Hei-
delberg, 1955, 10. Aufl., II.Band, S. 571
- 26) Witzgall, H.
"Die Verteilung von körperfremden Stoffen im Blut
und ihr Einfluß auf die Pharmakodynamik"
Habilitationsschrift 1951 (unveröffentlicht)
- 27) Witzgall, H. und H. Boyens
"Die Bedeutung der Bindung an Albumin, Körperzellen
und Bakterien für Pharmakodynamik und Wirkung von
Arzneistoffen am Beispiel der Sulfonamide"
Archives Internationales de Pharmacodynamie
et de Thérapie 148, (1964) 511-535
- 28) Witzgall, H. und H. Boyens
"Untersuchungen über die Sulfonamidbindung an Bakterien"
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde,
Infektionskrankheiten und Hygiene, I. Abt.
Originale 193, 200 (1964).

Inhalt.

Einleitung	- 2 -
Allgemeine Versuchsanordnung	- 4 -
Verteilungsversuche mit ³⁵ S-markierten Sulfonamiden	- 18 -
Diskussion	- 21 -
Zusammenfassung	- 31 -
Literaturverzeichnis	- 33 -

Lebenslauf.

Am 9. 9. 1928 wurde ich als Sohn des Landgerichtsrates Dr. jur. Walter Tränkmann und seiner Ehefrau Margarete, geb. Lange, in Chemnitz geboren. Nach Besuch der Volksschule wurde ich 1939 in die Oberschule in Chemnitz aufgenommen. An der Nikolai-Schule in Leipzig legte ich 1947 die Reifeprüfung ab. Nach einem 172 jährigen Musikstudium in Leipzig wurde ich im Sommersemester 1949 zum Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin immatrikuliert.

Während eines Besuches in Dresden wurde ich im März 1952 von sowjetzonalen Sicherheitsorganen verhaftet und als politischer Häftling 5 Jahre bis Februar 1957 festgehalten. Anschließend nahm ich das Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin wieder auf und legte im April 1961 die Ärztliche Prüfung vor dem Prüfungsausschuß in Berlin ab. Die Bestallung als Arzt wurde mir vom 7. 9. 1962 ab erteilt.

Seit Oktober 1962 bin ich als Assistenzarzt auf der Inneren Abteilung des Martin Luther-Krankenhauses, Berlin-Grünwald, unter Leitung von Prof. Dr. med. Hans WITZGALL tätig.

